

THESIS

Aus der Universitäts-Frauenklinik in Marburg/Lahn

(Direktor: Prof. Dr. med. R. Buchholz)

MARBURG

1968

Untersuchungen zur Bestimmung von Pregnan diol aus eiweißhaltigen Harnen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin
der hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Ingrid Hansen, geb. Pohlenz
aus Königsberg

Marburg 1968

Fotodruck: Erich Mauersberger, Marburg

Aus der Universitäts-Frauenklinik in Marburg/Lahn
(Direktor: Prof. Dr. med. R. Buchholz)

Untersuchungen zur Bestimmung von Pregnan diol aus eiweißhaltigen Harnen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin
der hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Ingrid Hansen, geb. Pohlentz
aus Königsberg

Marburg 1968

Fotodruck: Erich Mauersberger, Marburg

Angenommen von der Medizinischen Fakultät
der Universität Marburg am 6.2.1968

gedruckt mit Genehmigung der Fakultät

Dekan : Prof.Dr.med.R. Siegert

Referent : Prof.Dr.med. A. Würterle

Correferent : Prof.Dr.med. R. Buchholz

Inhalt s a n g a b e

	Seite
I. Progesteron und Pregnandiol	
1. Geschichte	1
2. Methoden des Pregnandioldnachweises	2
3. Progesteronbildung in Cyclus und Schwangerschaft	4
4. Die Wirkung des Progesterons	7
5. Biosynthese und Metabolismus	7
6. Die Pregnandiolausscheidung im Cyclus	9
7. Die Pregnandiolausscheidung in der Schwangerschaft	10
8. Die Pregnandiolausscheidung bei pathologischen Schwangerschaften	11
9. Pregnandioldmessung und Proteinurie	13
II. Die Versuche	
1. Methode	14
2. Apparate und Reagenzien	18
3. Eichkurve	19
4. Elutionsschema	20
5. Genauigkeit und Richtigkeit der Methode	22
6. Wiederfindungsversuche mit eiweißhaltigem Urin	28
7. Wiederfindungsversuche bei getrennter Aufarbeitung von enteweißtem Urin und gefälltem Eiweiß	31
8. Versuche mit verstärkter Extraktion	34
9. Versuche mit verlängerter Hydrolysenzeit	36
III. Diskussion	38
IV . Zusammenfassung	39
V . Literaturverzeichnis	IV



Digitized by the Internet Archive
in 2026

I. Progesteron und Pregnandiol

1) Geschichte

Wahrscheinlich äußerte P r e n a n t 1898 als erster die Vermutung, daß das Corpus luteum ein Organ mit innerer Sekretion ist. 1903 konnte F r a e n k e l zeigen, daß durch die Entfernung des Corpus luteum bei Hasen eine bestehende Schwangerschaft unterbrochen wird. Die charakteristischen Veränderungen, die das Uterus-Endometrium unter der Einwirkung des Corpus luteum durchmacht, wurden zuerst von B o u i n und A n c e l 1910 beschrieben. C o r n e r und A l l e n (1928) gelang es, einen hochgereinigten Extrakt der wirksamen Substanzen des Corpus luteum zu gewinnen. Mit diesem Extrakt konnten sie bei Hasen, trotz Entfernung des Corpus luteum, eine bestehende Schwangerschaft aufrechterhalten. 1934 schließlich wurde von vier voneinander unabhängig arbeitenden Gruppen (A l l e n und W i n t e r s t e i n e r ; B u t e n a n d t und W e s t p h a l ; S l o t t a , R u s c h i n g und F e l s ; H a r t m a n n und W e t t s t e i n) das aktive Hormon des Corpus luteum - das Progesteron - identifiziert und in kristalliner Form synthetisiert.

Schon fünf Jahre früher (1929) hatten M a r r i a n und B u t e n a n d t aus dem Harn schwangerer Frauen ein inaktives Steroid isoliert, dessen Strukturformel B u t e n a n d t aufstellte und das er Pregnandiol nannte. Die Ähnlichkeit der Struktur dieser Substanz mit der des Progesteron ließ eine metabolische Verwandtschaft zwischen ihnen vermuten. 1934 gelang auch in vitro die Umwandlung von Pregnandiol in Progesteron (B u t e n a n d t und S c h m i d t - T h o r n é). Zwei Jahre später berichteten V e n n i n g und B r o w n e , daß Pregnandiol im Urin nicht in freier Form sondern als wasserlösliches

Na-Salz der Glucuronsäure vorliegt. Im gleichen Jahr bewiesen sie die in vivo Umwandlung von exogenem Progesteron in Pregnandiol. Damit bestärkten sie die Vermutung, daß Pregnandiol ein inaktives Ausscheidungsprodukt des Progesterons ist. Mehrere Arbeitsgruppen stellten fest, daß die Pregnandiolausscheidung während der Schwangerschaft steigt. Dies ließ eine zunehmende Progesteronbildung der schwangeren Frau vermuten.

B r o w n e , H e n r y und V e n n i n g (1937), J o n e s und W e i l (1938), S e e g a r und D e l f s (1940) wiesen nach, daß in der Schwangerschaft schon wenige Wochen nach der Implantation die Plazenta die Hauptquelle des Progesterons ist. Durch Perfusionsversuche und biochemische Untersuchungen des Plazentagewebes wurden große Mengen Progesteron in der Plazenta nachgewiesen.

Trotz verfeinerter Methoden, wie z.B. Versuche mit radioaktiven Markierungen (B l o c h 1945 : Umwandlung von mit Deuterium markiertem Cholesterol in Urin-Pregnandiol bei schwangeren Frauen) und intensiver Forschung sind bisher bei weitem noch nicht alle Fragen der Bildung des Progesterons, seines Metabolismus und seiner Wirkung geklärt.

2) Methoden des Pregnandiolsnachweises

Seit M a r r i a n und B u t e n a n d t 1929 aus Schwangerenharn Pregnan-3 α -20 α -diol als Hauptmetaboliten des Progesterons isolierten, wurden viele Methoden zur Bestimmung des Pregnandiols im Harn beschrieben. Die erste klinisch brauchbare Methode stammt von V e n n i n g (1936). Dabei wird Pregnandiol gravimetrisch als Na-Pregnandiol-Glucuronid bestimmt. Mit dieser Methode ist es aber nicht möglich, weniger als 2 mg Pregnandiol in der Tagesurinmenge zu bestimmen,

was die Methode sehr einschränkt. Westphal (1944) änderte diese Methode ab und wies Pregnandiol als Bariumsalz der Glucuronsäure nach. Er erreichte damit zwar eine größere Empfindlichkeit, doch ist dieses Verfahren sehr zeitraubend. Auch die Modifikationen der Methode durch Maugham, Evelyn und Browne (1938), Allen und Viergiver (1941), Kaufmann und Westphal (1947) waren nicht zufriedenstellend. In dem von Astwood und Jones (1941) angegebenen Verfahren wird durch Säurehydrolyse in Gegenwart von Toluol Pregnandiol aus Pregnandiolglucuronid freigesetzt und nach Reinigung durch fraktionierte Fällung gravimetrisch gemessen. Talbot, Bermann, MacLachlan und Wolfe (1941) verbesserten diese Methode, indem sie das Pregnandiol in H_2SO_4 lösten und den sich bildenden gelben Farbkomplex colorimetrisch bestimmten. Sommerville, Gough und Marrion (1948) erhöhten die Genauigkeit dieses Nachweises durch Verbesserung der Fällungstechnik. Colorimetrische Verfahren, mit denen die Glucuronsäure des Na-Pregnandiolglucuronats bestimmt wurden, sind von Fischer, Zee-Zang-Zao, Rammer, Gutermaun angegeben worden. Bei anderen Methoden wurde das Pregnandiol durch Chromatographie gereinigt (deWattville, Borth, Gsell (1948), Chaney, McKee, Fischer und McColligan (1952), Stimmel, Randolph und Conn (1952). Aber die Endprodukte waren dabei noch nicht rein genug. Weitere Verfahren stammen von Dibbel (1955), Malék, Lennert und Tichy (1952), Baker, Bankroft und Lyda (1955), Jensen (1955). Zur Zeit gilt die von Kloppe, Michie und Brown (1954) ausgearbeitete Methode als die empfindlichste. Sie wurde auch in den eigenen Untersuchungen angewendet.

3) Progesteronbildung in Cyclus und Schwangerschaft

Das Progesteron ist ein C_{21} -Steroid, das von allen steroidbildenden Drüsen wie der Nebennierenrinde, dem Ovar und der Plazenta gebildet werden kann. Während des Cyclus ist das Corpus luteum die Hauptquelle des Progesterons. Es wird dort wahrscheinlich in den luteinisierten Granulosazellen gebildet. Aber auch im sprungreifen Follikel wurde es neuerdings nachgewiesen (Hoffmann und von Lamm, Hooker und Forbes).

Im Blut wird das Progesteron hauptsächlich von Plasma-Albuminen transportiert (Westphal, Haskins und Taubert 1963). Es ist dort während des Cyclus mit chemischen Methoden nicht nachweisbar (Zander), aber mit dem spezifischen und sehr empfindlichen Hooker-Forbes-Test (Hinsberg und Ober). Mit diesem Test wiesen Forbes, Kaufmann, Ober und Klein schon in der ersten Cyclushälfte Progesteron im Blut nach. Buchholz, Dibbelt und Schild stellten einen präovulatorischen Gipfel der Hooker-Forbes-Aktivität am 12. Cyclustag fest. Sie konnten diesen Befund durch Vergleiche der Basaltemperaturen und durch histologische Untersuchungen des Ovars und des Endometriums bestätigen. Nach Kloppe stammen diese in der Proliferationsphase nachgewiesenen Hooker-Forbes-Aktivitäten und die ebenfalls dann gefundenen Pregnandiolausscheidungen im Urin von Progesteron, das während des ganzen Cyclus in der Nebennierenrinde gebildet wird. Nach seinen Angaben sollen täglich 1 mg Pregnandiol im Urin von Progesteron der Nebennierenrinde stammen.

In der Sekretionsphase werden die Höchstwerte des Progesterons am 7.-8. Tag nach der Ovulation erreicht. Sie betragen dann maximal 0,05 μ /1ccm Blut. Danach nimmt die

Progesteronproduktion des degenerierenden Corpus luteum bis zur Menstruation langsam ab.

Die Hooker-Forbes-Aktivitäten im Serum und die Ausscheidung des Hauptabbauproduktes des Progesterons - des Pregnandiols - im Urin verhalten sich gleichsinnig.

Neben Progesteron sind noch zwei weitere biologisch aktive Gestagene bekannt, das $\Delta_4 - 3 - \text{Ketopregnen} - 20\alpha - \text{ol}$ und das $\Delta_4 - 3 - \text{Ketopregnen} - 20\beta - \text{ol}$. Sie wurden von Z a n d e r und v o n M ü n s t e r m a n n 1954 in der Plazenta gefunden. Diese beiden Isomere wurden später auch im sprungreifen Follikel und im Corpus luteum nachgewiesen. Sie sind dort in geringerer Konzentration als Progesteron vorhanden. Im Hooker-Forbes-Test zeigt das 20β - Isomer eine zweimal so starke Aktivität wie Progesteron, das 20α - Isomer ist fünfmal schwächer. Auch mit dem Clauberg-Test sind beide nachweisbar.

Tritt eine Befruchtung ein, so bildet das Corpus luteum während der ganzen Schwangerschaft Progesteron. Aber nur in den ersten Wochen der Gravidität hat es eine physiologische Bedeutung als Hormonbildner. Schon sehr früh liefert die Plazenta Progesteron in genügend hoher Menge. D e a n e und S e l i g m a n n (1953) wiesen nach, daß das Syncytium des Cytotrophoblasten der Plazenta das Hormon bildet. Der Progesterongehalt nimmt in der Plazenta während der Schwangerschaft zu. Z a n d e r fand, daß der mittlere Progesterongehalt in der gesamten Plazenta von 33,2% im 3.Monat auf 713,4% im 10.Monat steigt. Die Konzentration des Progesterons bleibt ziemlich konstant um 2% /g Plazentagewebe. Auch die beiden Hydroxy-Isomeren wurden in kleinen, ebenfalls während der Schwangerschaft ansteigenden Mengen in der Plazenta nachgewiesen.

Durch Messung des Progesterons im Blut der umbilicalen und uterinen Venen schätzten Z a n d e r und v o n M ü n s t e r m a n n

s t e r m a n n (1954) die von der Plazenta gebildete Progesteronmenge auf 100 mg/die im mittleren Drittel und auf 190 - 280 mg/die am Ende der Schwangerschaft. P e a r l m a n kam 1957 durch Versuche mit Isotopen zu ähnlichen Ergebnissen. Er fand, daß im Durchschnitt 250 mg pro Tag von der Plazenta in den mütterlichen Kreislauf abgegeben werden.

Messungen der Progesteronmenge im peripheren venösen Blut ergaben sehr niedrige Werte. Mit papierchromatographischen und spektrophotometrischen Methoden fanden Z a n d e r und v o n M ü n s t e r m a n n 1954 am Ende der Schwangerschaft $3,9 - 26,8 \mu\text{g}$ pro 100 ml Plasma. Dies entspricht durchschnittlich $7,8 \mu\text{g/ccm}$ Vollblut. E t o n und S h o r t (1960) fanden einen langsamen Progesteronanstieg von $2 \mu\text{g}/100$ ml Plasma in der 9. Woche bis $12 \mu\text{g}/100$ ml Plasma in der 35. Woche, danach einen raschen Anstieg bis zum Ende der Schwangerschaft ($17 \mu\text{g}/100$ ml Plasma in der 40. Woche). Die Ergebnisse von O e r t e l (1959) und G r e i g (1963) liegen in gleicher Größenordnung. F u c h s fand, daß die Progesteronwerte in den peripheren Venen ca. zehnmal niedriger sind als in den Uterusvenen am Ort des Plazentasitzes. Daraus könnte man schließen, daß das Progesteron direkt von der Plazenta zur Uterusmuskulatur gelangt, und daß das Progesteron im peripheren Blut nur eine Art "Überlauf" ist.

Ob die mütterliche Nebenniere und die Hypophyse einen Einfluß auf die Hormonproduktion der Plazenta haben, ist noch nicht geklärt. Die Progesteronbildung der Plazenta scheint auch - im Gegensatz zur Oestrogenbildung - weitgehend unabhängig zu sein vom foetoplazentaren Kreislauf (C a s s m e r 1959).

4) Die Wirkung des Progesterons

Die Funktion und Wirkungsweise des Progesterons sind noch nicht restlos bekannt. Progesteron ist das Hormon der Schwangerschaft. In jedem Cyclus führt es die Schleimhaut des Uterus von der Proliferationsphase in die Sekretionsphase und bereitet das Endometrium damit für die Implantation eines befruchteten Eies vor. Tritt eine Befruchtung ein, hemmt es weitere Ovulationen, hält den für die Entwicklung des Embryos notwendigen Zustand des Uterus aufrecht, fördert das Wachstum des Myometriums und soll die Kontraktionsfähigkeit der Uterusmuskulatur herabsetzen. Dieser letzte Punkt ist allerdings einstweilen nur im Tierversuch nachgewiesen (C s a p o 1956 und 1961). Die Wirkung des Progesterons ist dabei immer abhängig von der Anwesenheit von Oestrogenen. An der Schleimhaut des Uterus führt Progesteron zu verschiedenen stofflichen Veränderungen, wie zur Zunahme von Glycogen, Glucoproteiden, Mucopolysacchariden und Lipiden und zur Abnahme der Ribonucleoproteide. Es fördert Zellatmung und aerobe Glycolyse. Außerdem bewirkt es Veränderungen im ganzen mütterlichen Organismus; so die Verminderung des Tonus der glatten Muskulatur, den Fettansatz etc. Wie weit man das Wachstum der Brustdrüsen auf Progesteronwirkung zurückführen kann, ist noch nicht sicher. Auch darüber, ob das Progesteron an den Uteruskontraktionen bei Wehenbeginn ursächlich beteiligt ist, bestehen verschiedene Auffassungen.

5) Biosynthese und Metabolismus

Über die Biosynthese und den Metabolismus des Progesterons bestehen noch viele Unklarheiten. Die frühen Stufen der Biosynthese verlaufen in den verschiedenen steroidbildenden

Drüsen wahrscheinlich sehr ähnlich. Die Unterschiede hängen jeweils von der Konzentration bestimmter Enzyme ab. Eine Stufe in der Progesteronbildung ist das Cholesterin. Dies wies B l o c h schon 1945 nach, indem er mit Deuterium markiertes Cholesterin in Urinpregnandiol bei schwangeren Frauen umwandelte. 1960 konnte S o l o m diesen Befund bestätigen. Bei Durchflutung von Plazentazotten mit radioaktivem Cholesterin fand er markiertes Progesteron und Δ_5 Pregnen - 3 β ol - 20 on wieder. Diese letzte Substanz wird von der Plazenta und von allen steroidbildenden Drüsen durch das Enzym 3 β - ol - Dehydrogenase in Progesteron überführt, wie in vitro Versuche von P e a r l m a n 1954 zeigten.

Die Vorstufe des Cholesterins ist wahrscheinlich Azetat (B l o c h 1950).

In der Plazenta wird das Progesteron zu vielen verschiedenen inaktiven Steroiden und auch zu seinen beiden aktiven Isomeren abgebaut. Im Blut wird das Progesteron sehr schnell metabolisiert. Die Turn-over-Zeit, die Zeit, in der das in den Blutkreislauf geworfene Progesteron daraus eliminiert ist, beträgt nur 3,3 min (P e a r l m a n 1957). Ein Teil des Progesterons wird unverändert vom Fettgewebe aufgenommen. Der Hauptort der Inaktivierung ist nicht, wie man früher annahm, das Endometrium, sondern die Leber (V e n n i n g und B r o w n e). Im Tierversuch zeigten sich auch die Niere und periphere Gewebe am Umbau beteiligt.

Die Ausscheidung der inaktiven Metaboliten, die zum Teil als Glucuronsäureester eliminiert werden, erfolgt hauptsächlich durch die Galle (K l o p p e r , M a c n a u g h t o n 1959) und die Niere. Sie sind in den Faeces bzw. im Urin nachweisbar. Nach Gabe von radioaktivem Progesteron erscheint ca 35% der Radioaktivität im Urin (P e a r l m a n 1957) und etwa 30% in den

Faeces (D a v i s und Mitarbeiter 1960). Progesteron konnte im Urin mit biologischen Testverfahren nur in ganz geringen Mengen (1/2 Kanincheneinheit) gefunden werden (L o e w e und V o s s). Die Hauptausscheidungsprodukte im Urin sind Pregnan-3 α ol- 20 on und Pregnan-2 α -diol = Pregnandiol. Quantitativ gesehen ist Pregnandiol der bedeutendste Metabolit, obwohl nur etwa 10 - 20 % des gebildeten Progesterons als Pregnandiol ausgeschieden werden (Z a n d e r). Die anderen Abbauprodukte sind im Schwangerenurin in so geringen Mengen vorhanden, daß sie im Vergleich zu Pregnandiol vernachlässigt werden können (M a c k e r und K a m m).

In den letzten 20 Jahren wurde die Pregnandiolausscheidung weitgehend als Maß für die Progesteronbildung der Plazenta angesehen. In jüngster Zeit wurden aber Zweifel daran laut, da man z.B. nach Injektion markierten Progesterons und Messung des ausgeschiedenen radioaktiven Pregnandiols stark schwankende Werte (von 6 - 27 %) fand (H y t t e n, L e i t c h). Es ist auch ungeklärt, ob nicht auch andere C₂₁- Steroide Muttersubstanzen des Pregnandiols sein können (S i m m e r H. und S i m m e r J.). So ist z.B. die Umwandlung von Desoxycorticosteron in Pregnandiol bekannt (H a m b l e n , C u y l e r , A s h l e y). Sie spielt aber physiologisch keine Rolle.

6) Die Pregnandiolausscheidung im Cyclus

Die Angaben über die Pregnandiolausscheidung im Cyclus sind nicht übereinstimmend. So fanden K l o p p e r , M i c h i e und B r o w n mit der von ihnen angegebenen Methode (1954) in der Proliferationsphase Werte zwischen 0,78 und 1,5 mg/die, in der Lutealphase zwischen 2,1 und 4,2 mg/die. 1957 gibt K l o p p e r ähnliche Werte

an; in der Lutealphase fand er sogar 5 mg/die. T r o l l e (1955), der mit der von H u b e r variierten Methode von A s t w o o d und J o n e s arbeitete, konnte in der Proliferationsphase kein Pregnandiol nachweisen. Nach seinen Angaben liegen in der Sekretionsphase die Höchstwerte zwischen 3,5 und 7,5 mg/die. Die Ausscheidungswerte variieren stark von Frau zu Frau und bei einer Frau von Cyclus zu Cyclus. Nach Z a n d e r (1957) besteht eine Parallelität zwischen dem Hormongehalt des Corpus luteum und der Pregnandiolausscheidung im Harn.

7) Die Pregnandiolausscheidung in der Schwangerschaft

Die Pregnandiolausscheidung in der Schwangerschaft wird einheitlicher beurteilt. Die von älteren Autoren angegebenen Werte von 80 - 100 mg/die am Ende der Schwangerschaft werden heute allgemein als zu hoch angesehen. Bis zur 20. Woche nehmen die Pregnandiolwerte langsam zu bis zu 15 - 20 mg/die im Mittel. Dann folgt ein rascherer Anstieg bis etwa zur 35. Woche, in der die Mittelwerte bei 40 - 45 mg/die liegen. Danach bleiben die Werte etwa auf dieser Höhe (S h e a r m a n 1959 ; K l o p p e r und B i l l e w i c z 1963 ; B e n g t s s o n , D i c z f a l u s y und F u c h s 1962 ; R u s s e l und Mitarbeiter 1957). Die Schwankungen von Frau zu Frau sind jedoch sehr groß, besonders in der fortgeschrittenen Schwangerschaft. So fanden R u s s e l und Mitarbeiter (1957) in den letzten Wochen der Schwangerschaft Werte zwischen 35 und 70 mg/die, S h e a r m a n (1959) zwischen 20 und 75 mg/die. Über die Ausscheidung in den letzten Tagen vor der Entbindung gehen die Meinungen sehr auseinander. Es werden sowohl fallende als auch steigende Werte angegeben. Die von manchen

Autoren vermutete Relation zwischen fallenden Pregnandiolwerten und Beginn der Wehentätigkeit konnte nicht bestätigt werden. Post partum fällt die Pregnandiolausscheidung innerhalb weniger Tage zu Werten der Lutealphase ab.

8) Die Pregnandiolausscheidung bei pathologischen Schwangerschaften

Ob bei pathologischen Schwangerschaften die Pregnandiolausscheidung ein Maß für die Schwere der Erkrankung- oder für die Prognose des Foeten sein kann, ist in keiner Weise geklärt. Bei drohendem Abort wurden von S h e a r = m a n (1959), R a w l i n g (1959) und anderen Autoren erniedrigte Pregnandiolwerte lange vor dem Absterben des Kindes gefunden. Andere Arbeitsgruppen (P l o t z und D a r u p 1949 ; Z a n d e r 1951 ; K a i s e r 1953 ; R u s s e l 1957 ; F u c h s 1962) gaben Ausscheidungs- werte an, die im normalen Streubereich des Pregnandiols liegen. Andererseits wurde auch von stark verminderten Pregnandiolwerten bei normal verlaufender Entbindung und Geburt eines gesunden Kindes berichtet. P l o t z und D a r u p (1949), M ü l l e r (1951), K a i s e r (1952) und K e n n e t h (1962) sind der Auffassung, daß weder hohe noch niedrige Pregnandiolausscheidungen bei drohen- dem Abort von prognostischer Bedeutung sind.

Ähnlich ist die Situation bei Praeeklampsien. Schon 1938 bemerkten B r o w n e , H e n r y und V e n n i n g einen abnorm niedrigen Pregnandiolspiegel bei den meisten ihrer Patientinnen mit Praeeklampsie. Aber sie fanden keine Korrelation zwischen der Schwere der Erkrankung und der Pregnandiolausscheidung. Von vielen Autoren wurde diese Frage aufgeworfen, aber bis heute ist man noch nicht zu

endgültigen Ergebnissen gekommen. Von den meisten Untersuchern wurden bei mittelschwerer und schwerer Praeeklampsie verminderte Pregnandiolwerte gefunden (W e i l 1938 ; S m i t h G.S. und S m i t h O.W. 1938 ; d e W a t t e v i l l e 1951 ; H u g h e s und Mitarbeiter 1954 ; L a x 1958 ; W ü r t e r l e 1960). T r o l l e (1955), R u s s e l und P a i n (1957), C o y l e und D e w h u r s t (1957) berichteten ebenfalls von erniedrigten Werten - hatten aber andererseits auch Patientinnen mit normalen Pregnandiolwerten bei klinisch schweren Praeeklampsien neben leichten Erkrankungen mit sehr niedriger Pregnandiolausscheidung.

S i m m e r H. und S i m m e r J. (1959), E t o n und S h o r t (1960) untersuchten bei Praeeklampsie-Patientinnen mit erniedrigter Pregnandiolausscheidung den Progesterongehalt im peripheren Venenblut. Sie wollten damit die Frage klären, ob ein verminderter Pregnandiolspiegel ein Zeichen für verminderte Progesteronbildung und damit für eine Unterfunktion der Plazenta ist. Sie konnten keine gegen die Norm veränderten Progesteronwerte finden. Da jedoch der Progesteronspiegel im peripheren Blut gegenüber dem in den Uterusvenen stark erniedrigt ist (F u c h s 1962), ist es fraglich, wie weit Messungen in den peripheren Venen ein Bild von der Progesteronbildung geben können.

9) Pregnandiolmessung und Proteinurie

Ein Faktor stellt bei der Pregnandiolbestimmung im Urin bei Praeeklampsie die Richtigkeit der Werte in Frage : die Proteinurie. Schon 1941 machten B a c h m a n , L e e k l e y und H i r s h m a n darauf aufmerksam, daß Pregnandiol dann vermindert gefunden wird, wenn Eiweiß

im Urin auftritt. T r o l l e stellte 1955 den störenden Einfluß auf den Analysengang beim Pregnandiolsnachweis fest. B r a d b u r y und K e n t (1956) konnten zeigen, daß in vitro zugesetztes Eiweiß bei der Bestimmung des Pregnandiols zu erheblichen Verlusten führt. S i m m e r und S c a r i a n o (1959) wiesen dasselbe für Keto=steroiden nach, die ebenfalls bei Praeeklampsien vermindert gefunden werden. Sie konnten beweisen, daß ein Teil der Ketosteroiden an dem aus dem Urin ausgefällten Eiweiß hängt. Durch getrennte Aufarbeitung von Urin und ausgefälltem Eiweiß, das sie mit Schwefelsäure hydrolysierten, konnten sie eine höhere Ausbeute erreichen. Einen ähnlichen Erfolg hatten O e r t e l und E i k - N e s (1958), die bei Wiederfindungsversuchen von zugesetztem Na-Dehydroepiandrosteron aus Blutplasma nur 65 % wiederfanden, nach Präzipitation des Eiweißes und getrennter Aufarbeitung des Niederschlages aber eine Wiederfindungsquote von 85 % erreichten.

Angeregt durch diese beiden Arbeiten haben wir versucht, durch Ausfällung des Eiweißes aus Urinen von Praeeklampsie-Patientinnen und getrennter Aufarbeitung von enteiweißtem Harn und gefälltem Eiweiß die Wiederfindung zugesetzten Pregnandiols zu verbessern.

II. Die Versuche

1) Methode

Die Pregnan diolbestimmung im Urin wurde mit der von K l o p p e r , M i c h i e und B r o w n 1954 angegebenen Methode durchgeführt. Das Verfahren haben wir an einigen Stellen geringgradig verändert.

Es wurde Harn von Frauen mit normalem Cyclus, von gesunden Schwangeren und von Patientinnen mit Praeeklampsie verwendet. Konnte der Harn nicht sofort aufgearbeitet werden, wurde er ohne Zusatz bei -20°C eingefroren. Für eine Analyse wurde $1/20$ oder $1/40$ des 24-Stunden-Harns genommen. Dieser wurde mit Aqua dest. auf 150 ml aufgefüllt, in einen 500 ml Rundkolben überführt und mit 50 ml Toluol und einigen Siedesteinchen unter einem Rückflußkühler bis zum Kochen erhitzt. Zur Hydrolyse wurden 15 ml konz. Salzsäure durch den Rückflußkühler dazugegeben und weitere 10 min gekocht. Nach raschem Abkühlen unter fließendem Wasser wurde das Hydrolysat in einen Scheidetrichter überführt und 3 min geschüttelt. Die sich absetzende wässrige Phase wurde von der organischen Phase getrennt und erneut mit 50 ml Toluol extrahiert. Die beiden Toluolextrakte wurden vereint und nach Ablaufen allen Urins, der sich unterhalb der Emulsion abgesetzt hatte, mit 25 ml einer Lösung von 25% Natriumchlorid in n-NaOH 2 min geschüttelt. Die wässrige Schicht wurde mitsamt dem flockigen Niederschlag verworfen, die zurückbleibende Toluolschicht mit 50 ml einer frisch zubereiteten Lösung von 4% KMnO_4 in n-NaOH 10 min geschüttelt. Danach wurde die Permanganatphase entfernt und die Toluolphase 4-5 mal mit je 50 ml Aqua dest. ausgewaschen, bis die letzte KMnO_4 -Färbung verschwunden war. Um auch den

letzten Tropfen der Emulsion zu beseitigen, wurde die Toluolphase in ein 150 ml Schliffröhrchen filtriert (Schleicher-Schüll-Filter Nr. 595 entsprechend Whatman Nr.1), auf ein Volumen von ca 10 ml eingedampft und auf Zimmertemperatur abgekühlt.

1. Chromatographie

Eine teilweise mit Benzol gefüllte Chromatographiesäule wurde mit 3 g deaktiviertem Aluminiumoxyd beschickt. Über das Aluminiumoxyd kam eine 5 mm hohe Schicht von Seesand p.A. (im Gegensatz zu K l o p p e r , der Silbersand verwendete). Der Toluolextrakt wurde auf die Säule gegeben, das Schliffröhrchen mit wenigen ml Benzol ausgespült, die ebenfalls auf die Säule gegossen wurden. Nachdem alle Lösungsmittel durchgesickert waren, wurde die Säule mit 25 ml 0,8 % Alkohol in Benzol eluiert. Das Eluat, das Farbprodukte und einige schneller laufende Steroide enthielt, wurde verworfen. Die Säule wurde danach mit 12 ml einer Lösung von 3 % Alkohol in Benzol eluiert. In diesem Eluat befand sich das ganze Pregnandiol. Es wurde in besonderen Schliffröhrchen gesammelt. Die Eluatvolumina hängen von der Aktivität des Aluminiumoxydes ab. Sie wurden für jedes neu deaktivierte Aluminiumoxyd mit reinem Pregnandiol bestimmt. Das Eluat wurde dann unter Stickstoff verdampft (Apparat nach B r o w n 1955), da K l o p p e r festgestellt hatte, daß bei Versuchen mit kleinen Mengen Pregnandiol beim Verdampfen des Lösungsmittels unter Luft wechselnd starke Verluste eintraten.

Acetylierung und 2. Chromatographie

Der Pregnandiolrückstand der 1. Chromatographie wurde in 2 ml Benzol und 2 ml Acetylchlorid p.A. gelöst. Das

locker zugestöpselte Röhrchen ließ man dann ca 1 Stunde bei Zimmertemperatur stehen. In dieser Zeit trat die Acetylierung des Pregnandiols ein. Danach wurde die Lösung mit 25 ml Petrolaether in einen Scheidetrichter überführt und einmal mit 50 ml Aqua dest., einmal mit 25 ml einer 8 %-igen wässerigen Na_2CO_3 -Lösung und noch zweimal mit 25 ml Aqua dest. ausgewaschen. Nachdem der letzte Tropfen Wasser abgelaufen war, wurde die Lösung auf eine Chromatographiesäule gegeben, die auch mit Aluminiumoxyd und Seesand beschickt war, bei der aber anstatt Benzol Petrolaether verwendet worden war. Nach Durchsickern des Lösungsmittels wurde das Pregnandiol-diacetat mit 15 ml Benzol eluiert. Auch das Volumen des Benzols hängt von der Aktivität des Aluminiumoxydes ab. Das Lösungsmittel wurde wieder unter Stickstoff verdampft und der Pregnandiol-diacetat-Rückstand mindestens eine Stunde über Calciumchlorid im Exsiccator getrocknet.

Colorimetrie

K l o p p e r fügte für die Farbentwicklung etwa 10 mg Natriumsulfit und 10 ml konz. Schwefelsäure zu dem Trockenrückstand hinzu. Wir bereiteten eine 100 mg %-ige Lösung von Natriumsulfit in konz. Schwefelsäure, von der wir jeweils 10 ml den Trockenrückständen zusetzten. Wir konnten gegenüber der K l o p p e r 'schen Methode hierbei keine Unterschiede feststellen. Die Röhrchen wurden verschlossen, gut durchgeschüttelt und für 17 Stunden in ein Wasserbad von 25°C gestellt. Gegen einen Schwefelsäure-Leerwert wurde die Farbdichte der sich bildenden gelben Lösung bei $420 \text{ m}\mu$ an einem Spektralphotometer gemessen. K l o p p e r gibt eine Wellenlänge von $430 \text{ m}\mu$ an; wir fanden jedoch bei zahlreichen Bestimmungen das Absorptionsmaximum konstant bei $420 \text{ m}\mu$. Aus der abge=

lesenen Farbdichte wurde der Pregnandiol-diacetat-Gehalt an einer Eichkurve bestimmt. Den Pregnandiolgehalt erhält man durch Multiplikation mit 0,8. Dieser Faktor ergibt sich aus dem Verhältnis der Molekulargewichte.

Zu den Wiederfindungsversuchen

Bei den Wiederfindungsversuchen konnte die Pregnandiol-Stammlösung nicht direkt dem Urin zugesetzt werden, da das Aethanol der Stammlösung das Kaliumpermanganat reduziert und dadurch den Analysengang stört, was zu falschen Endergebnissen führt. Wir gingen daher so vor, daß wir aus der jeweils gebrauchten Menge Stammlösung das Aethanol verdampften und den Trockenrückstand, das Pregnandiol, in Aether lösten. Mit 5 x 5 ml Aether wurde das Pregnandiol zu dem zu untersuchenden Urin gegeben. In einem Wasserbad von 70°C wurde der Aether 20 min. lang abgedampft.

Zur Eiweißfällung

Die Eiweißfällung wurde mit 20 %-iger Trichloressigsäure durchgeführt. Zu der Analysenmenge Urin wurden 4 ml Trichloressigsäure zugesetzt und dies dann 30 min. scharf zentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen, der Eiweißbodensatz mit 30 ml Aqua dest. durchgeschüttelt und erneut mit 4 ml Trichloressigsäure 30 min. zentrifugiert. Die vereinten wässrigen Phasen und das Eiweiß wurden getrennt weiterverarbeitet.

2) Apparate und Reagenzien

Bei den Versuchen wurden nur Glasgeräte benutzt, die in Chromschwefelsäure, mit Leitungswasser und Aqua dest. gereinigt wurden.

Als Chromatographiesäulen verwendeten wir Glasrohre von 12 cm Länge und 10 mm Durchmesser, an deren unteren Enden G_3 -Fritten eingeschmolzen waren. Die Extinktion wurde bei 420 m μ am Spektralphotometer der Firma Carl Zeiss mit optisch geschliffenen Zellen von 1,0 cm gemessen.

Alle Reagenzien waren rein, entsprechend den Angaben der Herstellerfirmen (Merck, Riedel de Häen). Toluol, Benzol und Petrolaether (40°-60°) wurden zweimal destilliert. Benzol und Petrolaether für die Chromatographie wurden mit Aqua bidest. durchgeschüttelt, damit sie vollkommen wassergesättigt waren.

K l o p p e r deaktivierte das Aluminiumoxyd, indem er es bei Zimmertemperatur 10 Tage lang einer wassergesättigten Atmosphäre aussetzte. Er erhielt dadurch die Aktivitätsstufe 4 nach B r o c k m a n n. Bei uns wurde das Aluminiumoxyd, nachdem eine bestimmte Menge Aqua bidest. zugesetzt worden war, 1 Stunde in der Schüttelmaschine geschüttelt, dann 24 Stunden stehen gelassen und danach erneut 1 Stunde geschüttelt. Nach einem Vorschlag von Herrn Professor S t a e m m l e r (Universitäts Frauenklinik Kiel) verwendeten wir für die erste und zweite Chromatographie Aluminiumoxyd verschiedener Aktivität. Für die erste Chromatographie nahmen wir Aluminiumoxyd mit 3 % Aqua bidest. (97 g Al_2O_3 + 3 ml Aqua bidest.), für die zweite solches mit 9 % Aqua bidest. (91 g Al_2O_3 + 9 ml Aqua bidest.).

Die Aktivität wurde mit reinem Pregnandiol und Pregnandiol-diacetat geprüft. Die dazu nötige Stammlösung, die auch zu Wiederfindungsversuchen benutzt wurde, stellten

wir aus 100 ml aldehydfreiem, 2 x destilliertem Aethanol und 10 mg Pregnandiol bzw. Pregnandiol-diacetat her.

Die Lösung wurde bei + 4° C aufbewahrt.

Der Schering AG sei für die Testsubstanzen gedankt.

3) Eichkurve

Zur Bestimmung der Eichkurve wurden aus der Pregnandiol-diacetat-Stammlösung steigende Mengen in Schliffröhrchen pipettiert und das Aethanol unter Stickstoff verdampft. Zu dem Trockenrückstand wurden je 10 ml der 100 mg %-igen Lösung von Natriumsulfit in konz. Schwefelsäure gegeben. Nach 17 Stunden Stehen im Wasserbad wurde die Farbdichte gemessen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1 : Werte der Eichkurve

ml der 10 mg%igen Stammlösung	Pregnandiol im Ansatz γ	Extinktion
0,5	50	0,082
0,5	50	0,092
1,0	100	0,178
1,0	100	0,178
1,5	150	0,265
1,5	150	0,275

Die aus diesen Werten erhaltene Eichkurve zeigt die Abbildung 1.

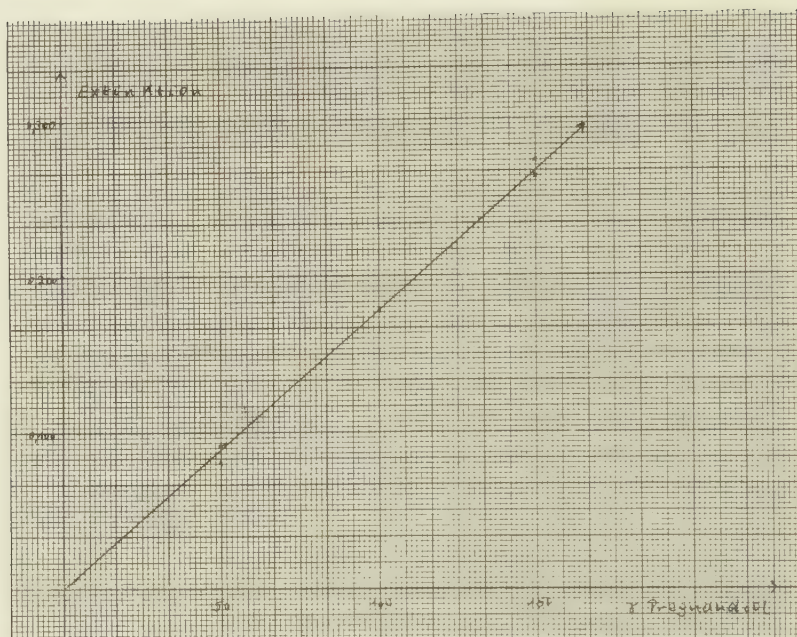


Abb. 1 : Eichkurve für Pregnanndiol-diacetat bei 420 m μ

4) Elutionsschema

Für die erste Chromatographie verwendeten wir ein Aluminiumoxyd, das 3 % Aqua bidest. enthielt. Von 2 ml Pregnanndiol-Stammlösung wurde das Aethanol unter Stickstoff abgedampft, der Trockenrückstand in 10 ml Benzol gelöst und die Lösung auf die Säule gegeben. Elutionsmittel waren :

a) 25 ml 0,8 % Alkohol in Benzol

b) 15 ml 3 % Alkohol in Benzol

Von dem Eluens a wurden die letzten 3 ml, von Eluens b 15 ml fraktioniert aufgefangen und getrennt auf normalem Wege weiterverarbeitet.

Die Extinktionswerte sind aus Tabelle 2 ersichtlich.

Tabelle 2 : Elutionswerte der 1. Chromatographie

Eluens a	Extinktion
die letzten 3 ml	0,005
Eluens b	Extinktion
1 - 3 ml	0,031
4 - 9 ml	0,175
10-12 ml	0,041
13-15 ml	0,005

Das Aluminiumoxyd der 2. Chromatographie enthielt 9 % Aqua bidest. Aus 2 ml Pregnandiol-diacetat-Stammlösung wurde das Aethanol abgedampft und der Rückstand in 15 ml Petrolaether gelöst und auf die Säule gegeben, Elutionsmittel war Benzol. Die letzten 3 ml des Lösungsmittels wurden aufgefangen, ebenso die einzelnen Fraktionen der 18 ml Benzol.

Weiterverarbeitung wie oben berichtet.

Die Extinktionswerte der 2. Chromatographie stehen in Tabelle 3.

Tabelle 3 : Elutionswerte der 2. Chromatographie

Eluens	Extinktion
die letzten 3 ml Lösungsmittel	0,001
Benzol	
1 - 3 ml	0,002
4 - 6 ml	0,305
7 -12 ml	0,040
13-15 ml	0,002
16-18 ml	0,003

5) Genauigkeit und Richtigkeit der Methode

Die Genauigkeit (Precision) der Methode wurde mit Doppelbestimmungen geprüft. Untersucht wurden Schwangerschaftsharne mit verschiedenem Pregnandiolgehalt. Die Ergebnisse wurden in drei Gruppen unterteilt, je nach Pregnandiolgehalt (Siehe Tabelle 4). Mit der Formel von S n e d i c o r wurde die Differenz zwischen den Doppelversuchen in Prozent in Bezug auf den Mittelwert errechnet :

$$s = \sqrt{\frac{S (d^2)}{2 \cdot n}}$$

s = Standardabweichung

d = Differenz

S (d²) = Summe aller d²

n = Anzahl der Versuche

$$p = \frac{S_1 + S_2}{2 \cdot n}$$

S₁ = Summe der 1. Bestimmungen

S₂ = Summe der 2. Bestimmungen

$$\% = \frac{100}{p} \times s \dots \dots \dots \text{Differenz in Prozent in Bezug auf den Mittelwert}$$

Tabelle 4 : Doppelbestimmungen

Pregnandiol in γ	Differenz in γ	Differenz in % in Bezug auf den Mittelwert der Gruppe 1
<u>Gruppe 1</u>		
21,6	-	
21,6		
23,2	0,8	
24,0		
28,8	6,4	
22,4		± 6,1 %
28,8	2,4	
26,4		

Pregnandiol in γ	Differenz in γ	Differenz in % in Bezug auf den Mittelwert d.Gr.1
54,4 49,6 53,6 62,4 73,7 73,7 79,2 80,0	0,8 8,8 - 0,8	$\pm 6,1 \%$
<u>Gruppe 2</u>		Differenz in % in Bezug auf den Mittelwert d.Gr.2
163,2 152,6 200,4 233,6 232,0 244,8 259,2 235,2 252,8 275,2 352,0 355,2 268,8 267,2 320,0 329,6 364,8 332,8 364,8 355,2 409,6 409,6	10,6 33,2 12,8 24,0 22,4 3,2 1,6 9,6 32,0 9,6 -	$\pm 4,45 \%$

Pregnandiol in γ	Differenz in γ	Differenz in % in Bezug auf den Mittelwert d.Gr.3
<u>Gruppe 3</u>		
505,6	38,4	
544,0		
678,4	51,2	
729,6		
889,6	51,2	
838,4		
870,4	51,2	
921,6		
988,4	9,2	
979,2		
1059,6	9,2	
1068,8		
1011,2	25,6	
985,4		
1113,6	25,6	
1088,0		$\pm 4,94 \%$
1132,8	57,2	
1190,4		
1152,2	25,4	
1177,6		
1241,6	112,0	
1353,6		
1152,0	128,0	
1280,0		
1318,4	115,2	
1203,2		
1676,8	153,6	
1830,4		

Die Ergebnisse der Tabelle 4 sind in Tabelle 5 zusammengefaßt :

Tabelle 5 : Doppelversuche, eingeteilt nach der Höhe der Pregnanliolwerte

Pregnanliol in γ	Anzahl der Versuche	Differenz in % in Bezug auf den Mittelwert
1 - 100	8	6,1
100 - 500	11	4,45
500 -2000	14	4,95

Die Richtigkeit (Accuracy) der Methode wurde durch Wiederfindungsversuche geprüft. Es wurde mit eiweißfreiem Harn aus Cyclus und Schwangerschaft gearbeitet. Der Mittelwert der Wiederfindung und die relative Streuung wurde mit dem von S n e d i c o r angegebenen Verfahren errechnet :

Mittelwert :

$$M = \frac{S_a}{N}$$

S_a = Summe d. wiedergefundenen Pregn.-Menge in %

N = Anzahl der Versuche

Relative Streuung

$$c = \frac{100 \times G}{M}$$

$$G = \sqrt{\frac{S(a^2)}{N} - \left(\frac{S_a}{N}\right)^2}$$

$S(a^2)$ = Summe d. Quadrate d. wiedergef. Pregn. Menge in %

Die Ergebnisse der Wiederfindungsversuche finden sich in Tabelle 6.

Tabelle 6 : Wiederfindung zugesetzten Pregnandiols aus eiweißfreiem Urin bei Zusatz des Pregnandiols vor der Hydrolyse

Zusatz an Pregnandiol γ	Wiederfindung in		Mittelwert der Wiederfindung in % u, relative Streuung
	γ	%	
80	78,4	98,0	$92,3 \pm 10,6 \%$
80	67,2	84,0	
80	83,2	104,0	
80	68,0	85,0	
80	86,4	108,0	
80	65,6	82,0	
80	68,0	85,0	
100	107,2	107,2	$97,5 \pm 7,3 \%$
100	99,2	99,2	
188	176,0	93,6	
188	169,0	90,2	
376	292,8	77,6	$90,0 \pm 8,4 \%$
376	330,4	87,8	
376	330,4	87,8	
376	339,2	90,2	
376	316,8	84,2	
376	390,4	104,4	
376	364,8	97,7	

Mittlere Wiederfindungsrate :

$$M = 92,9 \pm 9,2 \%$$

Tabelle 7 : Wiederfindung zugesetzten Pregnandiols aus eiweißfreiem Urin bei Zusatz des Pregnandiols nach der Hydrolyse

Zusatz an Pregnandiol γ	Wiederfindung in		Mittelwert der Wiederfindung in % u. relative Streuung
	γ	%	
200	198,4	99,2	98,3 $\pm$ 1,5 %
200	197,6	98,8	
200	193,6	96,8	
376	308,0	82,2	90,7 $\pm$ 7,9 %
376	377,6	100,3	
376	336,8	89,3	
376	352,0	91,2	

Mittlere Wiederfindungsrate :

$$M = 93,97 \pm 6,0 \%$$

Wurde das Pregnandiol vor der Hydrolyse zugesetzt, ergab sich eine Wiederfindungsrate von 92,9 $\pm$ 9,2 %. Setzte man es erst einen Analysenschritt später, nach der Hydrolyse, zu, so erhielt man einen Mittelwert der Wiederfindung von 93,97 $\pm$ 6,0 %.

6) Wiederfindungsversuche mit eiweißhaltigem Urin

Um die Abhängigkeit der Wiederfindungsrate von dem Eiweißgehalt des Harns zu untersuchen, wurden Wiederfindungsversuche mit Urinen steigenden Eiweißgehaltes durchgeführt. B r a d b u r y und K e n t hatten schon 1956 gezeigt, daß die Quote der Wiederfindung mit steigender Eiweißkonzentration abnahm. Sie hatten bei ihren Versuchen zu eiweißfreien Urinen bekannten Pregnandiolgehaltes Eiweiß verschiedenen Ursprungs zugefügt. Wir arbeiteten mit Praeeklampsie-Urinen, die einen Eiweißgehalt bis zu 12,2 ‰ hatten (bestimmt mit der Biuret-Methode), und setzten Pregnandiol zu.

Die gefundenen Werte zeigen die Tabellen 8 - 11.

Tabelle 8 : Wiederfindung zugesetzten Pregnandiols aus eiweißfreiem Urin

Zusatz an Pregnandiol γ	Wiederfindung in		Mittelwert der Wiederfindung in ‰ u.relative Streuung
	γ	%	
80	78,4	98	92,3 ± 10,6 ‰
80	67,2	84	
80	83,2	104	
80	68,0	85	
80	86,4	108	
80	65,6	82	
80	68,0	85	

Tabelle 9 : Wiederfindung zugesetzten Pregnandiols aus
Praeeklampsie-Urin mit 3,67 % Eiweiß

Zusatz an Pregnandiol ø	Wiederfindung in		Mittelwert der Wiederfindung in % u.relative Streuung
	ø	%	
80	72,0	90	81,85 ± 5,16 %
80	64,0	80	
80	64,1	80	
80	62,2	78	
80	63,2	79	
80	68,8	86	
80	64,2	80	

Tabelle 10: Wiederfindung zugesetzten Pregnandiols aus
Praeeklampsie-Urin mit 7,9 % Eiweiß

Zusatz an Pregnandiol ø	Wiederfindung in		Mittelwert der Wiederfindung in % u.relative Streuung
	ø	%	
80	57,0	71	66,4 ± 6,4 %
80	55,8	70	
80	50,2	63	
80	52,5	66	
80	50,0	63	

Tabelle 11 : Wiederfindung zugesetzten Pregnandiols aus
Praeeklampsie-Urin mit 12,2 ‰ Eiweiß

Zusatz an Pregnandiol %	Wiederfindung in		Mittelwert der Wiederfindung in % u. relative Streuung
	σ	%	
80	52,8	66	$54,85 \pm 15,77 \%$
80	44,8	56	
80	52,8	66	
80	40,0	50	
80	40,0	50	
80	32,2	40	
80	44,8	56	

An den Ergebnissen ist deutlich zu sehen, daß mit steigendem Eiweißgehalt die Wiederfindungsquote abfällt. Der Verlust nimmt hierbei linear mit der Eiweißkonzentration zu.

Abbildung 2 zeigt die graphische Darstellung dieses Ergebnisses.

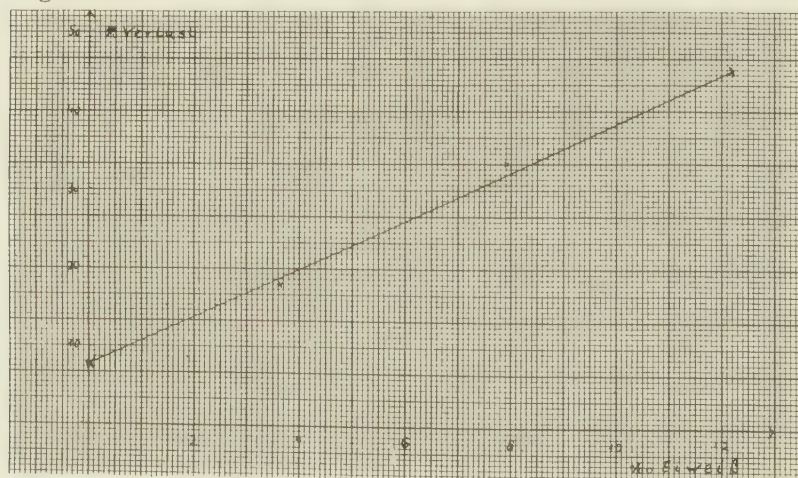


Abb. 2: Zunahme des Verlustes bei den Wiederfindungsversuchen mit steigender Eiweißkonzentration

7) Wiederfindungsversuche bei getrennter Aufarbeitung von enteiweißtem Urin und gefälltem Eiweiß

Wir versuchten, bei den Praeeklampsie-Urinen die Pregnandiolwiederfindung zu verbessern, indem wir das Eiweiß ausfällten und Eiweiß und enteiweißten Urin getrennt aufarbeiteten. Um bei allen Versuchen die gleichen Voraussetzungen zu haben, d.h. die gleiche Zusammensetzung des Eiweißes zu haben, wurde ein Urin hohen Eiweißgehaltes verdünnt zu Urinproben mit drei verschiedenen Eiweißkonzentrationen. Wir setzten den Urinen mit bekanntem Pregnandiolgehalt jeweils 100 γ Pregnandiol zu. Die gefundenen Werte sind in den Tabellen 12 - 14 dargestellt.

Tabelle 12 : Vergleich der Wiederfindung zugesetzten Pregnandiols bei normaler Aufarbeitung und getrennter Aufarbeitung von enteiweißtem Urin und gefälltem Eiweiß
Urinprobe I : 3,59 ‰ Eiweiß

A : Wiederfindung bei normaler Aufarbeitung

Pregn.in 10 ml Urin γ	Wiederf.nach Zusatz v.100γ Pr. γ %		Mittlere Wieder= findung %
79,2	173,6	94,4	88,8
80,0	163,2	83,2	

B : Wiederfindung bei getrennter Aufarbeitung

Pregn.aus Urin γ	Pregn.aus Eiweiß γ	Wiederf.aus Urin u.Eiweiß in %
113,6	49,6	83,6
111,2	49,6	81,2
110,4	45,6	76,4
105,6	40,0	66,0
97,6	51,0	69,2

Mittlere Wiederfindung : $75,28 \pm 7,38 \%$

Tabelle 13 : wie Tabelle 12

Urinprobe II : 7,18 ‰ Eiweiß

A : Wiederfindung bei normaler Aufarbeitung

Pregn.in 10 ml Urin γ	Wiederf.nach Zusatz v.100γ Pr.		Mittlere Wieder= findung %
	γ	%	
163,2	228,8	65,6	76,0
153,6	240,0	86,4	

B : Wiederfindung bei getrennter Aufarbeitung

Pregn.aus Urin γ	Pregn.aus Eiweiß γ	Wiederf.aus Urin u.Eiweiß in %
126,4	116,8	84,8
112,4	115,2	68,8
129,6	104,0	74,2
124,8	110,4	76,8
120,0	107,2	68,8

Mittlere Wiederfindung : $74,68 \pm 7,9 \%$

Tabelle 14 : wie Tabelle 12

Urinprobe III : 10,72 ‰ Eiweiß

A : Wiederfindung bei normaler Aufarbeitung

Pregn.in 10 ml Urin γ	Wiederf.nach Zusatz v.100γ Pr.		Mittlere Wieder= findung %
	γ	%	
252,8	320,0	67,2	59,2
275,2	326,4	51,2	

B : Wiederfindung bei getrennter Aufarbeitung

Pregn.aus Urin γ	Pregn.aus Eiweiß γ	Wiederf.aus Urin u.Eiweiß in %
139,2	189,6	64,8
140,8	177,6	54,4
140,2	187,2	63,4
132,8	185,6	54,4
131,2	182,4	49,6

Mittlere Wiederfindung : $57,32 \pm 10,15 \%$

In Tabelle 15 sind die Ergebnisse dieser drei Versuchsreihen zusammengefaßt.

Tabelle 15 : Vergleich der Wiederfindung zugesetzten Pregnandiols bei normaler Aufarbeitung und getrennter Aufarbeitung von enteiweißtem Urin und gefälltem Eiweiß

Eiweißgehalt der Urine in %	Wiederfindung in % bei	
	normaler Aufarbeitung	getrennter Aufarbeitung
3,59	88,8	75,3
7,18	76,0	74,8
10,72	59,2	57,2

Diese Versuche zeigen, daß ein großer Teil des Pregnandiols mit dem Eiweiß ausgefällt wird. Mit steigender Eiweißkonzentration nimmt der am Eiweiß haftende Anteil des Pregnandiols zu.

Weiter geht aus den Ergebnissen hervor, daß durch getrennte Aufarbeitung von enteiweißtem Urin und ausgefälltem Eiweiß die Wiederfindung zugesetzten Pregnandiols nicht verbessert wird. Es tritt sogar ein geringer Verlust auf. Dieser ist methodisch bedingt, da durch die getrennte Aufarbeitung die Fehlerquelle doppelt so groß ist.

8) Versuche mit verstärkter Extraktion

Im normalen Analysengang wird der Urin nach der Hydrolyse 2 mal mit je 50 ml Toluol 3 min lang durchgeschüttelt und dann verworfen, während die organische Toluolphase weiter verarbeitet wird. Wir versuchten, durch eine verstärkte Extraktion mit Toluol eine eventuell festere Bindung des Pregnandiols an das Eiweiß zu lösen und dadurch die Pregnandiolausbeute zu verbessern. Nach der 2. Extraktion verwarfen wir die wässrige Phase nicht, sondern schüttelten sie noch mehrmals mit je 50 ml Toluol durch. Die einzelnen Fraktionen wurden getrennt weiter verarbeitet. Wir untersuchten dabei wieder gesondert enteiweißten Urin und gefälltes Eiweiß. Die Ergebnisse sind in den Tabellen 16 - 18 dargestellt.

Tabelle 16 : Pregnandiolausbeute aus Praeeklampsie-Urinen bei getrennter Aufarbeitung von enteiweißtem Urin und gefälltem Eiweiß und verstärkter Extraktion
Urin I : 5,7 ‰ Eiweiß

A : Enteiweißter Urin

Fraktion	Pregnandiol ‰	Mehrgewinn an Pregn.	
		‰	%
1 + 2	94,4		
3	2,96	4,96	5,2
4	2,0		

B : Gefälltes Eiweiß

Fraktion	Pregnandiol ‰	Mehrgewinn an Pregn.	
		‰	%
1 + 2	91,2		
3	2,1		
4	2,5	6,5	7,1
5	1,4		
6	0,5		

Tabelle 17 : wie Tabelle 16

Urin II : 12,2 ‰ Eiweiß

A : Enteiweißter Urin

Fraktion	Pregnandiol γ	Mehrgewinn an Pregn. γ %	
1 + 2	364,8		
3	5,4	10,4	2,8
4	5,0		

B : Gefälltes Eiweiß

Fraktion	Pregnandiol γ	Mehrgewinn an Pregn. γ %	
1 + 2	544,0		
3	6,7		
4	3,5	17,2	3,1
5	4,0		
6	3,0		

Tabelle 18 : wie Tabelle 16

Urin III : 18,2 ‰ Eiweiß

A : Enteiweißter Urin

Fraktion	Pregnandiol γ	Mehrgewinn an Pregn. γ %	
1 + 2	556,8		
3	3,5		
4	5,8	13,8	2,5
5	4,5		

B : Gefälltes Eiweiß

Fraktion	Pregnandiol γ	Mehrgewinn an Pregn. γ %	
1 + 2	518,4		
3	8,0		
4	9,8	30,8	5,8
5	7,2		
6	5,8		

Durch die verstärkte Extraktion wird die Pregnandiolausbeute um wenige Prozent verbessert. Jedoch tritt dieser Mehrgewinn nicht nur bei der Aufarbeitung des gefällten Eiweißes auf, sondern genau so bei der des enteweißten Urins.

9) Versuche mit verlängerter Hydrolysenzeit

In dem angewandten Analysenverfahren wird der Urin mit Toluol und 15 ml konzentrierter Salzsäure 10 min am Rückflußkühler gekocht. Wir versuchten, durch Verlängerung der Hydrolysenzeit auf 20 und 30 min eine mögliche Pregnandiol-Eiweiß-Bindung zu spalten und dadurch die Pregnandiolausbeute zu erhöhen.

Die Ergebnisse stehen in den Tabellen 19 - 21.

Tabelle 19 : Vergleich der Pregnandiolausbeute bei verschieden langer Hydrolysenzeit
Urin I : 5,5 % Eiweiß

Hydrolysenzeit min	Pregnandiolausbeute %
10	364,8 355,2
20	352,0 355,2
30	364,8 332,8

Tabelle 20 : Vergleich der Pregnandiolausbeute bei verschieden langer Hydrolysenzeit

Urin II : 10,72 ‰ Eiweiß

Hydrolysenzeit min	Pregnandiolausbeute ‰
10	268,8 267,2
20	232,0 244,8
30	259,2 235,2

Tabelle 21 : Vergleich der Pregnandiolausbeute bei verschieden langer Hydrolysenzeit und getrennter Aufarbeitung von enteiweißtem Urin und gefälltem Eiweiß

Urin III : 5,7 ‰ Eiweiß

Hydrolysenzeit min	Pregnandiolausbeute	
	im Urin ‰	im Eiweiß ‰
10	94,4	91,2
20	89,6	82,4

Die Ergebnisse zeigen, daß durch die verlängerte Hydrolysenzeit ein Verlust in der Pregnandiolausbeute eintritt. Wahrscheinlich wird durch das längere Kochen ein kleiner Teil des Pregnandiols zerstört.

III. D i s k u s s i o n

Von vielen Autoren wurde berichtet, daß im eiweißhaltigen Urin schwangerer Frauen mit Praeeklampsie weniger Pregnandiol nachzuweisen ist als im Urin gesunder Schwangerer. Dies konnten wir bei eigenen orientierenden Versuchen auch feststellen. Bisher konnte nicht geklärt werden, ob Pregnandiol dabei vermindert ausgeschieden wird oder ob sein Nachweis im Urin mit den üblichen Methoden unzureichend ist. Es wäre möglich, daß bei Praeeklampsie durch eine Unterfunktion der Plazenta die Progesteronbildung und dadurch die Pregnandiolausscheidung vermindert ist. Es ist aber auch denkbar, daß Progesteron und Pregnandiol in einer dem Normbereich entsprechenden Höhe gebildet werden, daß aber bei Proteinurie das Pregnandiol zum Teil so an das Eiweiß gebunden ist, daß man es mit den üblichen Analysen nicht nachweisen kann. Für diese Annahme spricht, daß S i m m e r H. und S i m m e r J., E t o n und S h o r t bei Patientinnen mit Praeeklampsie, bei denen ein verminderter Pregnandiolspiegel im Urin festgestellt worden war, im peripheren Venenblut einen normalen Progesterongehalt fanden.

B r a d b u r y und K e n t konnten als erste zeigen, daß die Pregnandiolausbeute aus Schwangeren-Urinen durch Zugabe von Eiweiß zu den Urinen stark vermindert wird. Bei unseren Versuchen stellten wir eine Abnahme der Wiederingefindung zugesetzten Pregnandiols aus Praeeklampsie-Urinen mit steigendem Eiweißgehalt des Urins fest. Wir konnten nachweisen, daß ein Teil des Pregnandiols an dem aus dem Praeeklampsie-Urin ausgefällten Eiweiß haftet. Mit steigendem Eiweißgehalt nimmt die an dem Eiweiß haftende Pregnandiolmenge zu. Es war aber nicht möglich, durch getrennte Aufarbeitung von enteweißtem Urin und ausgefälltem Eiweiß eine bessere Ausbeute zu erhalten

als bei normalem Analysengang. Auch eine intensivere Behandlung des ausgefällten Eiweißes durch eine gegenüber der Methode von K l o p p e r , M i c h i e und B r o w n verstärkte Extraktion und verlängerte Hydrolysenzeit brachte keine Erhöhung der Wiederfindungsquote.

Die hier dargestellten Untersuchungsergebnisse beweisen allerdings nicht, daß bei Praeeklampsien die Progesteronbildung der Plazenta nicht doch vermindert ist, wie das z.B. R u s s e l und Mitarbeiter annehmen.

IV. Z u s a m m e n f a s s u n g

Es wurde ein kurzer Überblick über die Bildung, die Wirkung und Ausscheidung von Progesteron und Pregnandiol gegeben. Bei Versuchen zur Wiederfindung zugesetzten Pregnandiols aus Urinen von Frauen mit Praeeklampsie nahm die Wiederfindungsquote linear dem steigenden Eiweißgehalt ab. Die Wiederfindung konnte durch getrennte Aufarbeitung von enteiweißtem Urin und ausgefälltem Eiweiß nicht erhöht werden. Versuche mit verstärkter Extraktion und verlängerter Hydrolysenzeit brachten keine Besserung.

V. L i t e r a t u r v e r z e i c h n i s

- AMOROSO, E.L.
Endocrinology of pregnancy.
Brit. Med. Bull. 11 : 117 1955
- BAKER, W.S.; BANCROFT, C.E.; LYDA, E.W.
The value of urinary Pregnandiol determination as
an indication for the use of Progesterone in the
treatment of threatened abortion.
Am. J. Obstet. & Gynec. 69 : 405 1955
- BENGTSSON, L.Ph.; DICZFALUSY, E.; FUCHS, F.
Endocrinology of pregnancy and labour.
Acta Obstet. & Gynec. Scand. 41 : 1 1955
- BORTH, R.
Elimination du Pregnandiol au cours de la grossesse.
Les Steroides urinaires. Paris Masson & Cie 1954
- BRADBURY, J.T.; KENT, Th.H.
Protein hindrance of Pregnandiol recovery.
Endocrinology 60 : 162 1957
- BRADSCHAW, T.E.T.; JESSAP, W.J.E.
The urinary excretion of Estrogens and Pregnandiol
at the end of pregnancy, during labour and during
the early puerperium.
J. Endocrin. 9 : 427 1953
- BUCHHOLZ, R.; DIBBELT, L.; SCHILD, W.
Über die Bildung des Progesterons im mensuellen
Cyclus.
Geburtsh. u. Frauenheilk. 14 : 620 1954
- CORNER, G.W.; CSAPO, A.
Action of the ovarian hormones on the uterine muscle.
Brit. Med. J. 1 : 687 1953
- CSAPO, A.
The mechanism of effect of the ovarian Steroids.
Recent Progress in Hormone. Research 12 : 405 1956
- DAVIS, M.E.; PLOTZ, E.J.; LE ROY ; GOULD, ; WERBIN
Hormones in human reproduction. I Metabolism of
Progesterone.
Am. J. Obstet. 72 ; 740 1956
- DIBBELT, L.; HINSBERG, K.; ESSER, H.
Untersuchungen zur quantitativen Bestimmung von Preg-
nandiol (3 α , 20 α) im menschlichen Urin.
Hoppe-Seyler's Zeitschr. f. Physiol. Chemie 289 1952

- DICZFALUSY, E.; TROEN, P.
Endocrine functions of the human placenta.
Vitam and Hormon 19 : 229 1961
- FIESER, L.F.; FIESER, M.
Steroide.
Verlag Chemie Weinheim 1961
- FORBES, T.R.; ZANDER, J.
Metabolites of Progesterone with biologic activity in
human organism.
Recent Progress in Hormone. Research 13
- HINSBERG, K.; KONRAD, E.
Über den Hooker-Forbes-Test und seine Anwendung zur
Bestimmung des Progesteronspiegels im Blut bei
gleichzeitiger Bestimmung des Harnpregnandiols
während des Menstruationscyclus.
Zschr. Exper. Med. 124 : 153 1954
- HOFFMANN, Fr.; v.LAM, L.
Über die Progesteronbildung im Cyclus und in der
Schwangerschaft.
Zbl. f. Gynäk. 70 : 1177 1948
- HOHLWEG, W.
Über die Ausscheidung der Hormone im Harn.
Klin. Wochenschr. 22 : 45 1944
- HUGHES, E.S.; LLOYD, C.W.; JONES, D.; LOBOTSKY, J. ;
RIENZI, J.S.; AVERY, G.M.
Some recent observations concerning the toxemias
of pregnancy.
Am. J. Obstet. & Gynec. 67 : 782 1954
- HYTTEN, F.E.; LEITCH, J.
The physiology of human pregnancy.
Blackwell Scientific Publications Oxford 138 1964
- KAISER, R.
Die Pregnanliolausscheidung im Harn vor der Geburt.
Arch. f. Gynäk. 179 : 115 1951
- KAISER, R.
Die diagnostische Verwertbarkeit von Pregnandiol=
bestimmung in der Schwangerschaft.
Geburtsh. u. Frauenheilk. 13 : 513 1953
- KAISER, R.; EICHSTÄDTER, A.
Das Ausscheidungsverhältnis Östriol : Pregnandiol in
Cyclus und Schwangerschaft.
Arch. f. Gynäk. 185 : 726 1955

KAUFMANN, C.

Progesteron, sein Schicksal im Organismus und seine
Anwendung in der Therapie.

Klin. Wschr. 33 : 345 1955

KAUFMANN, C.; WESTPHAL, U.

Über die Ausscheidung des Pregnandiols im mensuellen
Cyclus.

Klin. Wschr. 24 : 910 1947

KAUFMANN, C.; WESTPHAL, U.; ZANDER, J.

Untersuchungen über die biologische Bedeutung der
Ausscheidungsprodukte des Gelbhormons.

Arch. f. Gynäk. 179 : 247 1951

KENNETH, J.R.

Hormones of the plazenta.

Am. J. Obstet. & Gynec. 84 : 310 1962

KLOPPER, A.J.

The excretion of Pregnandiol during the normal
menstrual cycle.

J. Obstet. & Gyn. British Empire 64 : 504 1957

KLOPPER, A.; BILLEWICZ, W.

Urinary excretion of Oestriol and Pregnandiol during
normal pregnancy.

J. Obstet. & Gyn. British Empire 70 : 1024 1962

KLOPPER, A.; MICHIE, E.A.; BROWN, J.B.

A method for the determination of urinary Pregnan-
diol.

J. Endocrin. 12 : 209 1955

LABHART, A.

Klinik der Inneren Sekretion.

Springer Verlag 1957

LAX, H.

Symposion Spättoxikose.

Geburtsh. u. Frauenheilk. 18 Heft 4 1958

LYON, R.

Pregnandiol excretion at the onset of labour.

Am. J. Obstet. & Gynec. 51 : 404 1946

MAUZEY, A.J.

Pregnandiol excretion at the time of labour.

Am. J. Obstet. & Gynec. 60 : 626 1950

OBER, K.G.; KLEIN, J.; WEBER, M.

Zur Frage einer Progesteronbehandlung. Experimentelle Untersuchungen mit dem Hooker-Forbes-Test und klinische Beobachtungen mit Kristallsuspensionen.
Arch. f. Gynäk. 184 : 543 1954

OERTEL, G.W.; EIK-NES, K.

Determination of Dehydroepiandrosterone in human blood plasma.
J. Biol. Chem. 232 : 543 1958

PEARLMAN, W.H.

Hormons in blood.
Colloquia on Endocrinology. Ciba Foundation 1957

PLOTZ, J.; DARUP, E.

Die Bedeutung des Progesterons und der Oestrogene bei der Entstehung und der Behandlung der Fehlgeburten.
Zbl. f. Gynäk. 71 : 867 1949

PLOTZ, J.; DARUP, E.

Die Bedeutung der Pregnandiolausscheidung im Harn für die Gynäkologie und Geburtshilfe.
Arch. f. Gynäk. 177 : 486 1950

RAK, K.

Die Pregnandiolausscheidung in der Schwangerschaft.
Zschr. f. Geburtsh. u. Gynäk. 130 : 307 1949

RAWLINGS, W.J.; KRIEGER, V.I.

The value of the Pregnandiol-excretion-test in the prognosis of abortion.
J. Obstet. & Gyn. British Empire 66 : 905 1959

RUSSEL, C.S.; PAIN, C.G.; COYLE, M.G.; DEWHURST, C.J.

Pregnandiol excretion in normal and abnormal pregnancy.
J. Obstet. & Gyn. British Empire 64 : 649 1957

SHEARMAN, R.P.

Some aspects of the urinary excretion of Pregnandiol in pregnancy.
J. Obstet. & Gyn. British Empire 66 : 1 1959

SIMMER, H.; SIMMER, J.

Progesteron im peripheren Venenblut von Schwangeren mit Spätgestose.
Klin. Wschr. 37 : 971 1959

SIMMER, H.; SCARIANO, N.

Der Einfluß zugesetzten menschlichen Albumins bei
der Bestimmung der Ketosteroide im Urin Schwangerer.
Klin. Wschr. 37 : 975 1959

SMITH, G.S.; SMITH, O.W.

Observations concerning the metabolism of Estrogens
in women.
Am. J. Obstet. & Gynec. 36 : 769 1938

STAEMLER, H.J.

Untersuchungen über die Harncorticoidausscheidung
bei Nephropathia gravidarum.
Arch. f. Gynäk. 182 : 759 1953

TAYLOR, E.H.; BRUNS, P.D.; HEPNER, H.J.; DROSE, V.E.

Measurement of placental function.
Am. J. Obstet. & Gynec. 76 : 983 1958

TULSKY, A.S.; KOFF, A.K.

Some observations on the role of the corpus luteum
in early human pregnancy.
Fertility & Sterility 8 : 118 1957

WATTEVILLE, H.D.

Pregnandiol determination in clinic and research.
J. Clin. Endocrin. 11 : 251 1951

WESTPHAL, U.

Interaction between Hydrocortisone-4-C¹⁴ or Progesterone-4-C¹⁴ and serum albumin as demonstrated by ultracentrifugation and electrophoresis.
Endocrinology 57 : 456 1955

WESTPHAL, U.

Spectrophotometric demonstration of interaction
between proteins and Progesterone, Desoxycortisone and Cortisol.
Arch. Biochem. Biophys. 66 : 71 1957

WESTPHAL, U.; FIRSCHEIN, H.E.; PEARCE, E.M.

Binding of Hydrocortisone-4-C¹⁴ and Progesterone-4-C¹⁴
to serum albumin, demonstrated by paper electrophoresis.
Science 121 : 601 1955

WILSON, R.B.; RANDALL, L.M.; OSTERBERG, A.E.

Studies on Pregnandiol.
Am. J. Obstet. & Gynec. 37 : 59 1939

WÜRTERLE, A.

125. Tagung der Mittelrheinischen Gesellschaft für
Geburtshilfe und Gynäkologie.
Geburtsh. u. Frauenheilk. 20 : 1275 1960

ZANDER, J.

Über das Verhalten des Progesterons im menschlichen
Organismus.
Geburtsh. u. Frauenheilk. 11 : 312 1951

ZANDER, J.

Die Ausscheidung des Pregnandiolkomplexes nach
Injektion von Progesteron beim Menschen.
Geburtsh. u. Frauenheilk. 14 : 402 1954

ZANDER, J.

Progesteron im menschlichen Blut und Gewebe. I. Pro=
gesteron im peripheren venösen Blut der Frau.
Klin. Wschr. 33 : 697 1955

ZANDER, J.

Die gestagen wirksamen Hormone im Organismus.
Geburtsh. u. Frauenheilk. 17 : 876 1957

ZANDER, J.

Die Hormonbildung der Plazenta und ihre Bedeutung
für die Frucht.
Arch. f. Gynäk. 198 : 113 1962

ZANDER, J.; v. MÜNSTERMANN, A.M.

Weitere Untersuchungen über Progesteron im mensch=
lichen Blut und Gewebe.
Klin. Wschr. 32 : 894 1954

ZANDER, J.; v. MÜNSTERMANN, A.M.

Progesteron im menschlichen Blut und Gewebe. III. Pro=
gesteron in der Plazenta, in der Uterusschleimhaut
und im Fruchtwasser.
Klin. Wschr. 34 : 944 1956

L e b e n s l a u f

Am 24. April 1938 wurde ich als Tochter des Landwirtschaftsrates Dr. Walter Pohlenz und seiner Ehefrau Hildegard, geb. Peschke in Königsberg/Ostpreußen geboren.

In Weilburg an der Lahn besuchte ich die Volksschule und das Gymnasium Philippinum und bestand dort am 2. März 1957 die Reifeprüfung. Mit dem Studium der Medizin begann ich im Wintersemester 1957/58 an der Philipps-Universität in Marburg. Dort legte ich am 7. August 1958 die naturwissenschaftliche und am 28. April 1960 die ärztliche Vorprüfung ab. Nach je einem Studiensemester an den Universitäten in Kiel und Wien kehrte ich nach Marburg zurück, wo ich mein Studium im Wintersemester 1963/64 mit dem medizinischen Staatsexamen abschloß.

Meine akademischen Lehrer waren die Herren Professoren und Dozenten :

in Marburg

Beckmann, Berendes, Bickel, Bock, Braun-Falco, Bücher, Dimroth, Exner, Förster, Groß, Gedigk, Hamm, Hartmann, Hensel, Hildebrandt, Hornung, Huber, Jacob, Lang, Linneweh, v.Manger-König, Mahr, Marx, du Mesnil de Rochemont, Meyer, Müller, Niessing, Nieth, Oehme, Petry, Pirson, Schmid, Schmitz, Schölmerich, Schrappe, Schwaiger, Seidel, Siess, Stender, Straub, Streicher, Walcher, Wendt, Würterle.

in Kiel

Anschütz, Doerr, Eufinger, Hertz, Reinwein, Wanke.

in Wien

Fellinger, Gitsch, Kunz, Pillat, Tulzer, Ullik, Zacherl.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Würterle für die freundliche Überlassung des Themas und die mir erwiesene wissenschaftliche Unterstützung. Ebenfalls danke ich Herrn Professor Huber für die Erlaubnis zur Benutzung der Laboratorien und Apparaturen der Universitäts-Frauenklinik in Marburg.

